

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Effet antibactérien de *Lactobacillus* à l'égard de bactéries multirésistantes aux antibiotiques

Présenté par :

Bouzidi Thilali & Hamouche Syla

Soutenu le : **lundi 25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{me} MERZOUK H.

M^r TOUATI A.

M^{me} OUKIL N.

M^r BENDJEDDOU K.

MAA

professeur

MCA

MCB

Président

Encadreur

Examineur

Co-promoteur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience pour accomplir ce travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promoteur Touati Abdelaziz pour sa gentillesse et sa sympathie, ses précieux conseils, son aide et assistance durant toute la période du travail.

Nous sincères remerciements à Mr Bendjeddou Kamel pour son aide précieuse et pour le temps qu'il nous a consacré ainsi qu'à Melle Mairi qui était à nos coté le long de ce travail.

Nous remercions également les membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

À mon frère Koussaila, ma sœur Lynda et ma nièce Mélina qui m'ont Soutenu tout au long de mon cursus.

À toute ma famille, ma camarade Thilali et sa famille, mes amies Lydia, Theziri et Nora à toute la promotion 2018 des sciences alimentaires et de microbiologie.

Sylia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*Aux deux personnes qui comptent le plus pour moi, à ceux qui m'ont soutenu
tout le long de ma vie et de mes études, à mes chers parents.*

Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

*À mes sœurs Tinhinane, Lahna, Kahina et mes frères Loucif et Kousseila ainsi
qu'à toutes mes nièces et mes neveux (Massilia, Farhat, Dany, Daniel, Ghilas,
Kanza et Myrina).*

*À toute ma famille, mon fiancé, ma camarade Sylia et sa famille, mes amis,
Lynda, Nawal, Dida, Widad et Liza.*

À toute la promotion 2018 de science alimentaire.

Thilali

Liste des abréviations

ATB : antibiotique.

BLSE : β -lactamases à spectre élargie.

C3G : Céphalosporines de troisième Génération.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

ERT : Ertapénème.

FICI: facteur d'indice concentration inhibitrice.

GN: gélose nutritive.

IMP : Imipénème.

KPC-3 : *Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase.

mcr-1 : résistance mobilisée à la colistine .

MH: Mueller Hinton.

MRS: Man- Rogosa et Sharp.

NDM-1: New Delhi métallob- β -lactamases.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

TSB : Bouillon de soja tryptique.

VIM : Veroneintegron code métallob- β –lactamase..

MRD : résistance multidroque.

Liste des figures

Figure 1 : Méthode de microdillution.

Figure 2: Activité antibactérienne des souches lactobacillus obtenu par la méthode des spots vis-à-vis d'*E. coli* et *S. aureus*

Figure 3: Résultats d'activité antibactérienne des souches de lactobacillus vis-à-vis d'*E. coli* et *S.aureus*.

Figure 4: Activité antibactérienne des souches lactobacillus par la méthode de puits vis-à-vis des souches multi-résistants

Figure 5 : Test de synergie de l'Ertapeneme et de surnageant de *lactobacille negelii* chez les souches *K. pneumoniae kpc-3* et *K. pneumoniae NDM-1*.

Liste des tableaux

Tableau 1: Habitat des Lactobacillus.

Tableau 2 : Différentes souches de bactéries lactiques testées.

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude et leurs profils de résistant.

Tableau 4 : Préparation de gamme d'antibiotiques (Ertapénem)

Tableau 5: Activité antibactérienne (mm) du surnageant de culture natif de chaque lactique via à vis des souches multi-résistants.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	01
Chapitre I: Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques	
I.1. Généralités.....	02
I.2. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques.....	03
I.2.1. Modifications de la molécule d'antibiotiques.....	03
I.2.1.1. Altérations chimiques de l'antibiotique.....	03
I.2.1.2. Destruction de la molécule d'antibiotique.....	03
I.2.2. Diminution de la perméabilité	03
I.2.3. Efflux actif.....	04
I.2.4. Modification de la cible.....	04
Chapitre II: Lactobacillus	
II.1. Généralités sur les lactobacilles.....	06
II.2. Pouvoir antimicrobien des lactobacilles	06
II.2.1. Production des acides organiques.....	07
II.2.2. Production de diacétyle	07
II.2.3. Production de dioxyde de carbone	07
II.2.4. Production d'autres composés organiques de faible poids moléculaire	07
II.2.5. Production de bactériocines.....	08
II.3. Applications de l'effet antimicrobien des lactobacilles.....	08
II.3. Les probiotiques.....	08
II.3.2. Alternative aux antibiotiques	09
Matériel et méthodes	
1. Origine des souches.....	11
2. Revivification	12

3. Détermination de l'activité antibactérienne	12
3.1. Test des spots.....	13
3.2. Test des puits.....	13
4. Teste de synergie	13
4.1. Préparation de la gamme d'antibiotique.....	14
4.2. Préparation de l'inoculum	14
4.3. Préparation de la microplaque	15

Résultats

1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	18
1.1. Test de spots	18
1.2. Test des puits.....	19
2. Test de synergie sur milieu liquide par la technique des microdilutions.....	21

Discussion et Conclusion.....	23
--------------------------------------	-----------

Références bibliographiques.....	24
---	-----------

Introduction

L'élevage est une activité économique très importante dans de nombreux pays, les animaux élevés sont exposés à des conditions de stress et à des infections bactériennes, parasitaires et virales ce qui entraîne d'importantes pertes économiques (Guérin *et al.*, 2012).

L'utilisation des antibiotiques depuis leur découverte à nos jours, a pris de l'ampleur soit comme traitement curatif appliqué à des animaux malades soit comme un traitement préventif pour éviter l'apparition de certaines pathologies, ou encore comme un promoteur de croissance pour l'amélioration de la performance zootechniques (Gunal *et al.*, 2006).

L'antibiothérapie a entraîné des problèmes graves tels que l'apparition des bactéries multi-résistantes et l'apparition de leurs résidus dans la viande. La résistance microbienne aux antibiotiques et la présence de résidus dans les produits d'origine animale sont très nocifs pour le consommateur, ce qui a mené à une tentative de réduction de leur utilisation dans la production animale (Faye *et al.*, 2005).

Depuis 2006, l'utilisation des antibiotiques comme additifs en alimentation animale est formellement interdite par l'union européenne, ce qui a amené à développer des alternatives en utilisant soit des microorganismes bénéfiques (probiotiques) ou des ingrédients non digestibles comme les prébiotiques qui favorisent la croissance de la flore intestinale (Adil *et al.*, 2011).

Les probiotiques ont été définis comme des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Ces microorganismes influencent la santé de l'animale en les protégeant de certaines infections intestinales, participent à la digestion et stimulent le système immunitaire. Notamment les lactobacilles qui suscitent beaucoup d'intérêt aussi bien en alimentation humaine qu'animale. (FAO/WHO, 2002). Plusieurs espèces probiotiques utilisées tels que *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, et *Saccharomyces* exercent un effet bénéfique. (Kalavathy *et al.*, 2003).

La présente étude a pour objectifs, dans un premier temps :

- Tester l'activité antibactérienne des lactobacilles
- Tester l'effet synergique avec les antibiotiques sur des souches multi-résistantes aux antibiotiques avec *K. pneumoniae* KPC-3 et *K. pneumoniae* NDM-1.

I. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

I.1. Généralités

L'activité des antibiotiques contre les agents pathogènes bactériens est une condition préalable à l'efficacité clinique. À cette fin, l'activité des antibiotiques contre les agents pathogènes bactériens est normalement mesurée par des méthodes de laboratoire normalisées pour déterminer la sensibilité et la résistance. Les infections causées par des souches bactériennes classées comme sensibles à un antibiotique peuvent être traitées avec ce médicament avec une forte probabilité de succès clinique (bien que des facteurs supplémentaires puissent contribuer à déterminer le résultat éventuel). D'autre part, les infections causées par des souches bactériennes qui sont classées comme résistantes à un antibiotique sont susceptibles de ne pas répondre au traitement avec cet antibiotique, qui ne doit pas être utilisé pour le traitement. La catégorisation des souches bactériennes comme sensible ou résistant à la suite d'un test de sensibilité est basée sur la comparaison des résultats avec des valeurs de référence de concentrations minimales inhibitrices (ou des diamètres d'inhibition de zone) indiqués comme des points critiques (Rossolini *et al.*, 2014).

Il n'est pas surprenant que les bactéries aient développé des mécanismes sophistiqués de résistance aux antibiotiques pour éviter d'être tué par ces molécules antimicrobiennes. Il est à noter que la résistance à une classe d'antimicrobiens peut généralement être obtenue par de multiples mécanismes distincts, et une cellule bactérienne est capable d'utiliser un de ces mécanismes de résistance pour survivre à l'effet d'un antibiotique (Munita *et al.*, 2016). Les mécanismes biochimiques par lesquels les bactéries résistent à l'action inhibitrice des antibiotiques comprennent (Rossolini *et al.*, 2011).

- Présence d'une enzyme qui modifie ou qui hydrolyse l'antibiotique;
- Modification de la cible d'antibiotiques par mutations ou par des mécanismes post-traductionnels qui réduisent la liaison de l'antibiotique à sa cible;
- Acquisition de voies métaboliques alternatives à celles inhibées par le médicament. Ce mécanisme est appelé bypass.
- Réduction de l'accès de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule bactérienne, en raison de la perméabilité réduite des enveloppes cellulaires ou par efflux actif.
- Résistance due aux adaptations globales des cellules

Lorsqu'un mécanisme de résistance est présent et fonctionnel dans la plupart ou toutes les souches d'une espèce bactérienne, l'espèce est classée comme intrinsèquement résistante aux

antibiotiques affectés par ce mécanisme et la résistance peut être prédite directement à partir de l'identification bactérienne. D'autre part, la résistance acquise se produit lorsque les souches d'une espèce sensible acquièrent un ou plusieurs mécanismes de résistance (Rossolini *et al* 2014).

La résistance acquise peut être due à des mutations dans les gènes chromosomiques ou à l'acquisition de déterminants de résistance par des mécanismes de transfert horizontal de gènes. Les gènes de résistance transférable sont habituellement portés par des plasmides ou d'autres types d'éléments génétiques mobiles et contribuent de manière significative à l'évolution de la résistance microbienne (Rossolini *et al* 2014).

I.2. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

I.2.1. Modifications de la molécule d'antibiotiques

L'une des stratégies bactériennes les plus réussies pour faire face à la présence d'antibiotiques consiste à produire des enzymes qui inactivent l'antibiotique en ajoutant des groupements chimiques spécifiques à la molécule antibiotique ou qui détruisent la molécule elle-même, rendant l'antibiotique incapable d'interagir avec sa cible (Munita *et* Arias., 2016).

I.2.1.1. Altérations chimiques de l'antibiotique

De nombreux types d'enzymes modifiantes ont été décrits et les réactions biochimiques les plus fréquentes qu'elles catalysent comprennent i) l'acétylation (aminoglycosides, chloramphénicol, stréptogramines), ii) la phosphorylation (aminoglycosides, chloramphénicol) et iii) l'adénylation (aminoglycosides, lincosamides). (Munita *et* Arias., 2016).

I.2.1.2. Destruction de la molécule d'antibiotique

Le mécanisme principal de la résistance aux β -lactamines repose sur la destruction de ces composés par l'action des β -lactamases. Ces enzymes hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame, rendant l'antimicrobien inefficace (Munita *et* Arias ., 2016).

I.2.2. Diminution de la perméabilité

Plusieurs antibiotiques utilisés dans la pratique clinique ont des cibles bactériennes intracellulaires ou, dans le cas de bactéries Gram-négatives, situées dans la membrane cytoplasmique (la membrane interne). Par conséquent, le composé doit pénétrer à travers la membrane externe et / ou cytoplasmique afin d'exercer son effet antimicrobien. Les bactéries ont développé des mécanismes pour empêcher l'antibiotique d'atteindre sa cible intracellulaire ou périplasmique en diminuant l'absorption de la molécule antimicrobienne. Les molécules

hydrophiles telles que les β -lactamines, les tétracyclines et certaines fluoroquinolones sont particulièrement affectées par les changements de perméabilité de la membrane externe car ils utilisent souvent des canaux de diffusion hydrophiles connus sous le nom de porines pour traverser cette barrière. Le principal exemple de l'efficacité de cette barrière naturelle des bactéries Gram-négatifs vis-à-vis de la vancomycine par défaut de pénétration à travers la membrane externe. (Munita *et* Arias., 2016).

I.2.3. Efflux actif

Les pompes à efflux bactériennes peuvent être catégorisées comme des transporteurs primaires ou secondaires selon la source d'énergie utilisée, le premier type utilise l'hydrolyse de l'ATP et le second un gradient de force motrice du proton (ou du Na⁺).

Ces systèmes peuvent être spécifiques au substrat, transporteurs drogues spécifiques, et conférer une résistance vis-à-vis d'un seul antibiotique particulier tel que les déterminants *tet* pour la tétracycline. Cependant, la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structure très différente et contribuer ainsi de manière significative à la multi-résistance naturelle (intrinsèque) et acquise des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (MDR pour multidrug resistance). Ce mécanisme de résistance affecte est une large gamme de classes d'antimicrobiens comprenant des inhibiteurs de la synthèse de protéines, des fluoroquinolones, des β -lactamines, et des polymyxines. Les gènes encodant les pompes drogue-spécifiques sont souvent retrouvés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui encodent les pompes MDR sont pour la plupart chromosomiques (Cattoir *et al.*, 2004). Il est important de noter que les pompes codées par le chromosome peuvent expliquer la résistance intrinsèque de certaines espèces bactériennes à un antibiotique particulier (par exemple, une résistance intrinsèque d'*E. faecalis* à la stréptogramine A) (Munita and Arias., 2016).

I.2.4. Modification de la cible

Une stratégie commune pour que les bactéries développent une résistance aux antibiotiques est d'éviter l'action de l'antibiotique en interférant avec leur site cible. Pour ce faire, les bactéries ont développé différentes mécanismes, y compris la protection de la cible (éviter que l'antibiotique puisse atteindre son site de liaison) et des modifications du site cible qui entraînent une diminution de l'affinité pour la molécule d'antibiotique (Munita *et* Arias., 2016).

L'introduction de modifications sur le site cible est l'un des mécanismes les plus communs de résistance aux antibiotiques chez les agents pathogènes bactériens affectant

Synthèse bibliographique

presque toutes les familles d'antibiotiques. Ces changements de cible peuvent consister en i) des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour le site cible, ii) des altérations enzymatiques du site de liaison (par exemple, l'addition de groupes méthyle) et / ou iii) le remplacement ou la dérivation (bypass) de la cible initiale. (Munita *et* Arias., 2016).

II. *Lactobacilles*

II.1. Généralités sur les lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques ubiquitaires qui colonisent beaucoup d'habitats (Tableau 1). Ce sont des bactéries Gram+ asporulées, immobiles, en forme bacille isolé ou groupées en paires ou en chaînette. Elles forment des colonies de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Ce sont des anaérobies facultatifs ayant un pH optimum de croissance de 5,5 avec une température optimale de croissance comprise entre 30 et 40°C (Hammes *et al.*, 2009).

Les lactobacilles ont un métabolisme énergétique saccharolytique où le lactate est l'acide organique majoritaire (De Vuyst L *et al.*, 1994).

Les lactobacilles ont des besoins nutritionnels complexes, ils exigent un milieu riche en hydrate de carbone comme les glucides, les acides aminés, peptides, lipides, et vitamines (Hammes *et al.*, 2009).

Tableau1 : Habitat des lactobacillus

Habitat	Espèces rencontrées	Activité ou produit
Matériau végétal en décomposition. Laiterie	<i>Lb.plantarum</i> , <i>Lb. Casei</i> , <i>Lb. Acidophilus</i> . <i>Lb.delbrukii</i> , <i>Lb. Lactis</i>	Cornichons, ensilage et choucroute. Fromage, yaourt, etc.
Tractus gastro-intestinal des animaux. Oral	<i>Lb. Salivrus</i> , <i>Lb. Gasseri</i> , <i>Lbrhamnosus</i> . <i>Lb. Casei</i> , <i>Lb. Plantarum</i> .	/
Vagin des mammifères	<i>Lb.Vaginalis</i>	/

II.2. Pouvoir antimicrobien des lactobacilles

Les lactobacilles sont connues pour leur capacité de produire lors de leur croissance, des composés actifs doués d'une activité antagoniste à l'égard d'un grand nombre de microorganismes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (Matilla-Sandholm *et al.*, 1999).

L'activité antimicrobienne des lactobacilles est due à la production de plusieurs substances comme : les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique), le peroxyde d'hydrogène et le dioxyde de carbone. L'inhibition peut être aussi due à la production de bactériocines (Nissen-Meyer *et al.*, 1997).

II.2.1. Production des acides organiques

Grâce à la production des acides organiques, en particulier l'acide lactique et l'acide acétique, les lactobacilles diminuent le pH du milieu, dans lequel ils se multiplient, en inhibant la croissance d'une autre partie de la flore qui s'y développe comme les bactéries pathogène dans les produits alimentaires fermentés, le tube digestif et le tractus génital humain et animal (Zalanet *al.*, 2010).

Les acides lactique et acétique ont un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (De Vuyst et Vandamme, 1994). Cependant, certaines bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés « la réponse de tolérance aux acides » dû à l'exposition long à des pH acides. Ce mécanisme de résistance leur permet de survivredurant le transit intestinal (Dortu *et Thonart.*, 2009).

II.2.2. Production de diacétyle

Le diacétyle est produit suite à la dégradation du citrate, il est synthétisé par différentes espèces de bactéries lactiques appartenant à plusieurs genres comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Il présente des propriétés antimicrobiennes contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques. La concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition dépend essentiellement du microorganisme cible (Dortu *et Thonart.*, 2009).

II.2.3. Production de dioxyde de carbone

Le CO₂ est formé pendant la fermentation hétérofermentaire, il crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation du CO₂ dans la bicouche lipidique peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Dortu *et Thonart*, 2009).

II.2.4. Production d'autres composés organiques de faible poids moléculaire

Plusieurs composés organiques de faible poids moléculaire doués d'activité antibactérienne sont produits par les lactobacilles comme la reutérine qui inhibe les enzymes à groupement thiol Elle présente un large spectre d'activité qui inclue des bactéries, des champignons et des protozoaires (Ganzleet *al.*, 2000).

II.2.5. Production de bactériocines

Les lactobacilles sont connus par leur production de bactériocines ayant une activité antibactérienne sur des espèces souvent proches à l'espèce productrice, cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produise (Klaenhammer., 1993). Ils sont capables de produire des bactériocines de toutes les classes, certaines de ces bactériocines sont douées à la fois d'activités antibactérienne et antifongique comme la Pentocine TV35b produite par les *lacobacillus pentosus*.

Les concentrations minimales inhibitrices varient considérablement d'une espèce bactérienne à une autre et même entre souches appartenant à la même souche. Des travaux ont décrit des substances d'origine bactérienne ayant une activité antimicrobienne, nommées « bacteriocin- likesubstances », ce sont des composés qui ne sont pas complètement caractérisés mais présentant plusieurs caractéristiques de bactériocines. Plusieurs substances de ce types sont produites par les lactobacilles et inhibent une large gamme de bactéries et de champignons (Ganzleet *al.*, 2000).

II.3. Applications de l'effet antimicrobien des lactobacilles

II.3.1. Les probiotiques

Les lactobacilles ont été largement exploités comme probiotiques pour la prévention des bactéries pathogènes. Les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes vivants lorsqu'ils sont consommés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur l'organisme hôte. Il s'agit de bactéries ou de levures présents dans des aliments. (Zalanet *al.*, 2010)

Les probiotiques exercent des activités antibactériennes contre diverses bactéries pathogènes et notamment contre les microorganismes fréquemment responsables d'infections comme : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli* (Zalanet *al.*, 2010)

De nombreuses expériences confirment les effets des souches probiotiques, notamment les lactobacillus:

- L'administration de *Lactobacillus salivarius* à des poussins nouvellement éclos permet de diminuer le taux des pathogènes (coliformes) et augmenter le taux des lactobacilles dans le jabot dès le premier jour d'administration. (YanKraaijC *et al.*, 1999)

- *Lactobacillus salivarius* permet la prévention des infections gastro-intestinales à *Listeria*, cet effet antibactérien est attribué à la bactériocine ABP-118. (Zacconi *et al.*, 1999).
- La Bovamine est une bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus*, qui est responsable de la prévention des infections dues à *Escherichia coli* chez les bétails (Brashears *et al.*, 2003).
- Il y a également des rapports concernant l'emploi de mélanges de différentes souches de *Lactobacillus salivarius* et *Lactobacillus plantarum* inhibent *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. L'administration simultanée de *Salmonella Enteritidis* et *Lactobacillus salivarius* par voie orale à des poussins d'un jour a permis une élimination complète des Salmonelles après 21 jours (Pascual *et al.*, 1999).

II.3.2. Alternative aux antibiotiques

L'antibiothérapie est le moyen le plus souvent utilisé pour traiter les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, l'administration d'antibiotiques, peut causer des effets indésirables tels qu'une perturbation de la flore intestinale et des complications rénales ou hépatiques (Beaugerie *et Petit.*, 2004). De plus, l'apparition de bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique, au point que certains cliniciens craignent que des infections dues à ces germes créant des situations échec thérapeutiques. Ainsi, la recherche de nouvelles alternatives s'oriente particulièrement vers l'emploi de probiotiques ou de leurs métabolites. (Woodford *et Livermore.*, 2009).

Les microorganismes probiotiques les plus étudiés sont les bactéries lactiques, en particulier les Lactobacilles.

En effet, certaines bactériocines sont actives contre les pathogènes alimentaires ou les bactéries responsable d'altération. Les bactériocines présentent une sécurité d'utilisation puisque elles sont produites par des souches non pathogènes et non toxigènes. (Chu *et al.*, 2009). Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces proches de la souche productrice (Klaenhamme, 1988). En plus de l'effet antimicrobien les bactériocines peuvent avoir un effet synergique avec les antibiotiques sur des souches résistantes.

Synthèse bibliographique

L'effet synergique de bactériocines et antibiotiques est peu étudié. Cependant, rare sont les travaux qui ont été réalisés. D'après Neghmouchi et *al.*, (2013), l'association des bactériocines aux antibiotiques augmente l'effet de ces derniers.

1. Origine des souches

Les souches tests de *Lactobacillus* (Tableau 2), ont été isolées à partir d'un fromage artisanale en 2017 par Mr Bendjeddou, elles ont été conservées à - 20 °C dans du bouillon MRS additionné de 20 % de glycérol.

Tableau 2: Différentes souches de bactéries lactiques testées.

Souches	Identification
S2	<i>Lactobacillus Aquaticus</i>
S4	<i>Lactobacillus Nagelii</i>
S5	<i>Lactobacillus Nagelii</i>
S6	<i>Lactobacillus Nagelii</i>
S8	<i>Lactobacillis Curvatus Melibiosus</i>
S9	<i>Lactobacillus Ghanensis</i>
S11	<i>Lactobacillus Saniviri</i>
S12	<i>Lactobacillus Nagelli</i>
S13	<i>Lactobacillus Rhamnosus</i>
S14	<i>Lactobacillus Composti</i>
S18	<i>Lactococcus Lactis Subsp Tructae</i>
S21	<i>Lactobacillus Nagellii</i>
S22	<i>Lactobacillus Nagellii</i>
S23	<i>Lactobacillus Ghanensis</i>
S24	<i>Lactobacillus Aquaticus</i>
S25	<i>Lactobacillus Aquaticus</i>
S28	<i>Lactobacillus Acidophilus</i>
S29	<i>Lactobacillus Negelii</i>
S40	<i>Lactobacillus Plantarum</i>

L'activité antibactérienne des 19 souches lactiques est testée d'une part à l'égard de deux espèces pathogènes sensibles aux antibiotiques, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et d'autre part à l'égard de 8 bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, faisant parties de la collection des souches du laboratoire d'écologie microbienne (tableau 3).

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude et leurs profils de résistant

souches cibles	Résistance
<i>E coli mcr-1</i>	Résistance à la colistine
<i>A. Boumannii VEB-1</i>	Résistance aux Céphalosporines 3 ^{ème} génération
<i>K.pneumoniae NDM-1</i>	Résistance aux carbapénèmes
<i>K.pneumoniae KPC-3</i>	Résistance aux carbapénèmes
<i>K.pneumoniae BLSE</i>	Résistance aux céphalosporines 3 ^{ème} generation
<i>E. coli SHV-12</i>	Résistance aux céphalosporines 3 ^{ème} generation
<i>Pseudomonas aeruginosa VIM</i>	Résistance aux carbapénèmes
<i>SARM</i>	Résistance à la méthicilline

2. Revivification

La revivification des lactobacilles a été effectuée par des repiquages successifs sur bouillon MRS à pH = 6,5 jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance bactérienne. L'incubation a été réalisée dans une étuve à 37°C pendant 24h.

3. Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard des souches cibles a été étudiée en utilisant leurs cultures jeunes en spots ou leur surnageant de culture (natifs) par la méthode des puits.

3.1. Test des spots

L'activité antibactérienne des lactobacilles à l'égard des souches pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* a été mise en évidence par le test d'antagonisme direct. Après avoir coulé la gélose MRS dans les boîtes, un volume 5µl de la suspension bactérienne (10^6 UFC/ml). chaque souche lactique a été déposé en spots sur la gélose MRS. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18h. Après la période d'incubation, les boîtes ont été recouvertes de 10 ml d'une gélose nutritive (GN), préalablement ensemencée avec la souche cible, puis ré-incubées à 37°C. Après 24h d'incubation, la présence ou l'absence d'une d'inhibition autour des spots est notée (Schillinger *et* Lucke ., 1989).

3.2. Test des puits

Afin de tester l'activité antibactérienne du surnageant de culture des souches lactiques à l'égard de souches cibles, des cultures des souches lactiques préparées dans du bouillon MRS ont été centrifugées à 12000g/ pendant 30 min à 4°C. Après centrifugation, nous avons récupère le surnageant et nous avons teste son activité envers les souches cibles multi résistantes (Tableau 3). Le protocole est comme suit :

Un millilitre (1ml) de la suspension des souches cibles (10^6 UFC/ml) est ensemencé en masse dans 20 ml de gélose Mueller Hinton. Après solidification de la gélose, des puits de 6mm de diamètre sont réalisés dans la gélose. Les puits ont été par la suite remplis par 100µl de surnageant natif, et les boîte ont été mis au réfrigérateur pendant 2h à 4°C. Après cette période, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne est révélée par la présence de zones d'inhibition autour des puits Barefoot *et* Klaenhammer .,1983).

4. Teste de synergie

Par définition, le nombre d'unités arbitraires (UA) est égale à l'inverse de la plus forte dilution qui donne une zone d'inhibition (ou absence de croissance dans la microplaque).

Selon Naghmouchi *et al.*, (2013), la synergie entre le surnageant et l'antibiotique peut être évaluée en calculant un facteur appelé «facteur de l'Index de la Concentration Inhibitrice» ou « FICI ». Ce facteur est calculé par la formule suivante :

$$FICI = \frac{\text{CMI de l'ATB dans le mélange}}{\text{CMI de l'ATB seul}} + \frac{\text{CMI du surnageant dans le mélange}}{\text{CMI de surnageant seul}}$$

La synergie est considérée comme positive (présence de synergie) si $FICI \leq 1$ et négative (absence de synergie) si $FICI > 1$.

Pour étudier la synergie entre l'antibiotique et le surnageant de cultures nous avons procédé comme suit :

4.1. Préparation de la gamme d'antibiotique

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'értapénème sont déterminées en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide qui permet d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Ainsi, la poudre de l'értapénème est dissoute dans l'eau distillée stérile, à partir de cette solution des dilutions sont effectuées (Tableau 4)

Tableau 4 : Préparation de la gamme de dilutions d'antibiotiques (Ertapénème)

Concentration de la solution initiale (mg/l)	Volume prélevé (ml)	Volume de diluant (ml)	Concentration obtenue (mg/l)	Concentration finale (mg/ml)
10240	3	9	2560	128
2560	7	7	1280	64
2560	3	9	640	32
2560	2	14	320	16
320	7	7	160	8
320	3	9	80	4
320	1	7	40	2

4.2. Préparation de l'inoculum

Des suspensions bactériennes de *K. pneumoniae* NDM -1 et de *K. pneumoniae* KPC-3 ont été préparées en dissociant 3 à 5 colonies dans 2 ml d'eau physiologique stérile. L'inoculum est ajusté à 10^6 UFC/ml.

4.3. Préparation de la microplaque

Pour réaliser le test de synergie entre l'értapénème et le surnageant, une microplaque stérile de 96 puits est utilisée, pour chaque souche lactique étudiée 4 lignes de 8 puits ont été utilisées, selon le schéma suivant :

- Première ligne : 100µl de surnageant
- Deuxième ligne : 100µl d'ertapénème à 128 mg/l.
- Troisième ligne : 50l de surnageant + 50 µl ERT à 128mg /ml.
- Quatrième ligne : 100µl TSB stérile (Témoin).

A partir du premier puits de chaque ligne, des dilutions en cascade à raison de deux sont effectuées (en utilisant le bouillon TSB) jusqu'au dernier puits. Ensuite, 100µl de suspension bactérienne sont ajoutés à tous les puits de toutes les lignes. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h. La résistance de la souche à l'antibiotique ou à la bactériocine est révélée par un dépôt (croissance) de cellules bactériennes au fond du puits.

Une synergie entre l'antibiotique et le surnageant est détectée par la présence d'une croissance bactérienne dans les puits de surnageant et de l'antibiotique, et l'absence de croissance dans les puits contenant le mélange des deux antibactériens à la même concentration ou à des concentrations plus faibles que les deux antibactériens séparés.

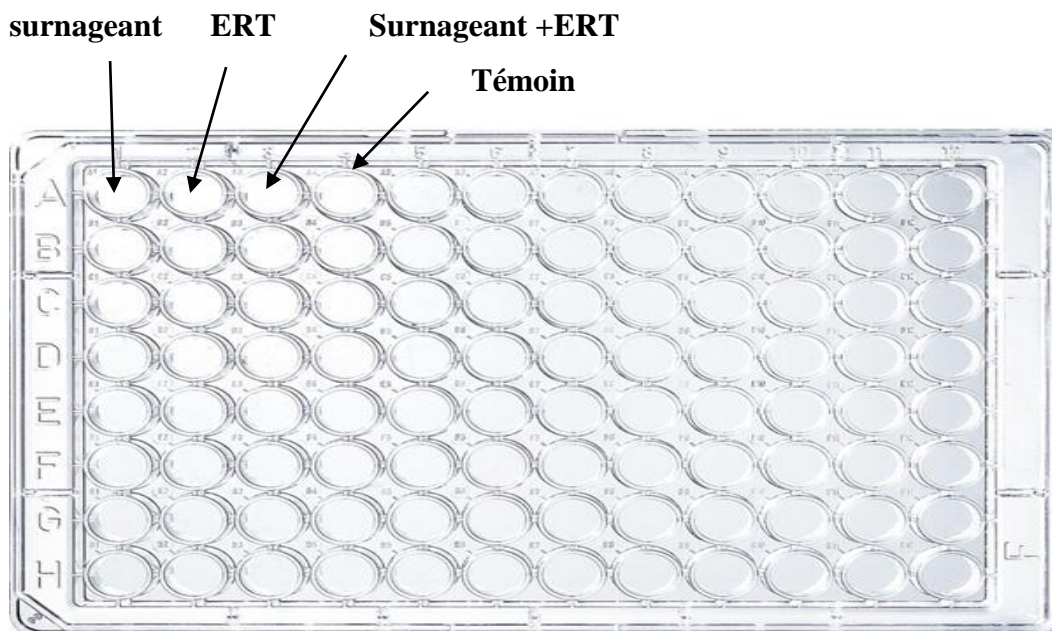


Figure 1 : Schéma de microplaque

1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

1.1. Test de spots

Parmi les 19 souches de *Lactobacillus* testées, 14 ont montré un effet antagoniste à l'égard de *S. aureus*, et 18 souches ont montré un effet antagoniste à l'égard d'*E. coli*. Les diamètres varient entre 20 et 31 mm selon les souches étudiés (figure 2)

La meilleure activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* a été enregistrée avec les souches **S02, S09 et S21**. Concernant *S. aureus*, la meilleure activité a été enregistrée avec les souches **S28, S02 et S24**. En outre l'activité la plus faible à l'égard de la souche *E. coli* a été enregistrée chez les souches **S08**, et pour *S. aureus* c'est la **S09**. Les souches **S06, S13, S23, S40** n'ont montré aucun effet antagoniste à l'égard de *S. aureus*, la même chose pour la souche S40 à l'égard de *E.coli*.

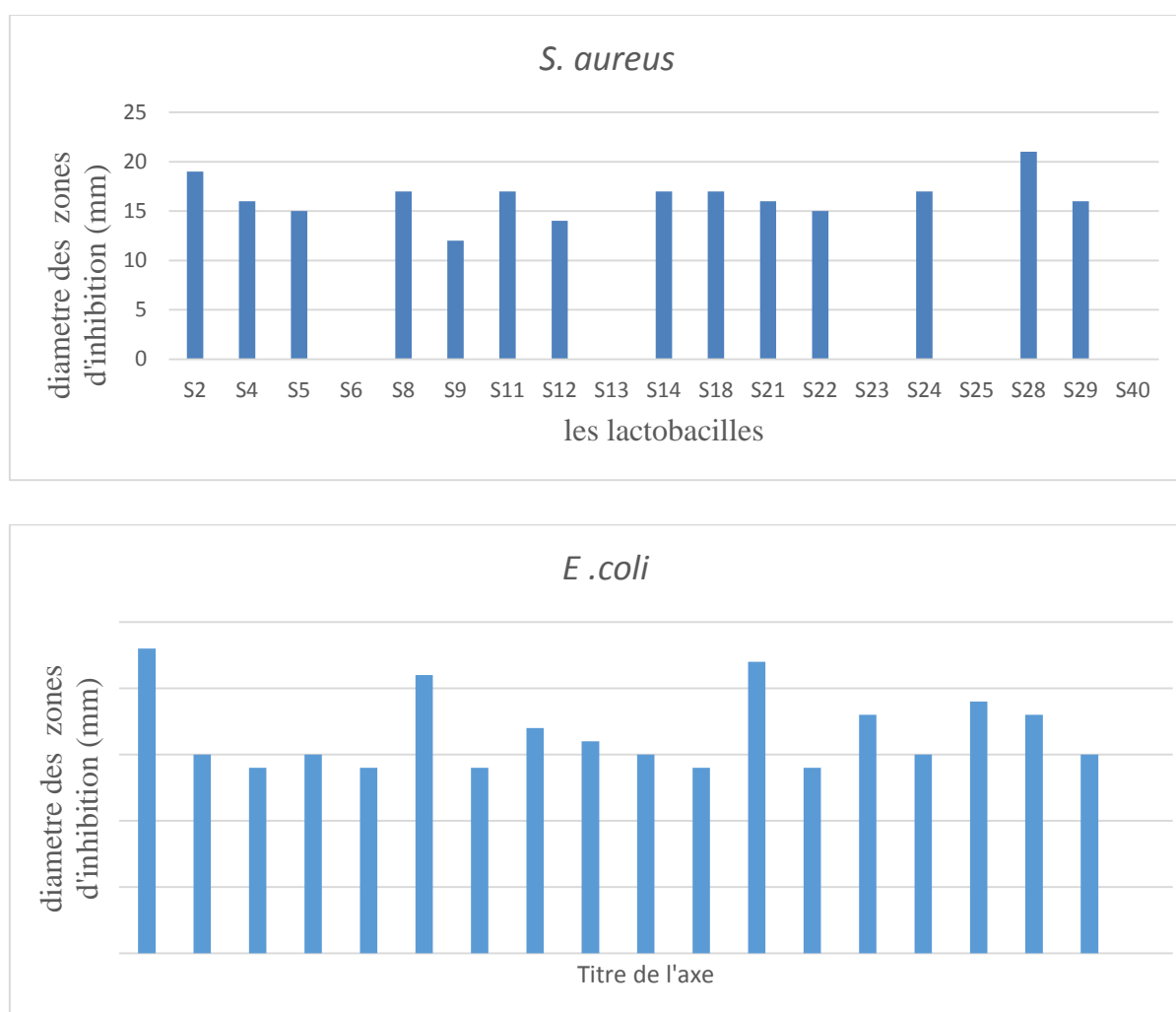


Figure 2: Activité antibactérienne des souches de lactobacilles obtenue par la méthode des spots vis-à-vis d'*E. coli* et de *S. aureus*.



Figure 03 : Résultats d'activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis d'*E. coli* et *S.aureus*.

1.2. Test des puits

Les résultats de l'activité antibactérienne du surnageant de culture natif des souches lactiques à l'égard des souches cibles est présentée dans le tableau 5 et la figure 4. La meilleure activité antibactérienne a été enregistrée avec les surnageants de cultures des souches de *Lactobacillus* S21, S22 à l'égard de *K. pneumoniae* NDM-1 et *P. aeruginosa* VIM respectivement. La plus faible activité antibactérienne concerne les surnageants des souches S6 et S12 à l'égard de *A. baumannii* VEB-1 et le *SARM* respectivement.



Figure 4 : Figure représentant activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* par la méthode des puits de vis -à- vis *A. baumannii* VEB-1 et *K pneumoniae* NDM-1

Tableau 5 : activité antibactérienne (mm) du surnageant de culture natif de souche lactobacillus via à vis des souches multi-résistants.

<i>Souche</i>	<i>E.coli mcr1</i>	<i>A baumannii VEB-1</i>	<i>K pneumoniae NDM-1</i>	<i>K pneumoniae KPC-3</i>	<i>K pneumoniae CTX-M-15</i>	<i>E coli SHV- 12</i>	<i>SARM</i>	<i>P aeruginosa VIM</i>
<i>ATB</i>	<i>Colistine</i>	<i>C3G</i>	<i>carbapénème</i>	<i>carbapénème</i>	<i>C3G</i>	<i>C3G</i>	<i>carbapénème</i>	<i>methiciline</i>
S02	6	6	6	6	6	6	6	6
S04	6	6	6	6	6	6	6	6
S05	6	6	6	6	6	6	6	16
S06	6	12	6	19	6	6	6	6
S08	19	6	6	6	16	14	6	6
S11	6	6	6	6	6	13	6	6
S12	6	6	6	6	6	6	11	6
S13	6	6	6	6	6	6	6	12
S18	6	6	6	6	6	6	6	6
S19	6	6	6	6	6	6	6	6
S22	6	6	21	6	6	6	6	14
S23	6	6	6	6	6	6	6	6
S24	6	6	6	6	6	6	6	20
S25	6	13	6	6	6	6	6	6
S28	6	6	6	6	6	6	6	6
S40	6	6	6	6	6	6	6	6

6 : Zone d'inhibition faible

2. Test de synergie sur milieu liquide par la technique des microdilutions

Les résultats de l'étude de la synergie entre l'értapénème et le surnageant de la culture de *Lactobacillus* à l'égard des souches de *K. pneumoniae NDM-1* et *K. pneumoniae KPC-3*, ont montré la présence d'une synergie entre l'ATB utilisé et les substances antibactériennes contenues dans le surnageant de *Lactobacillus* (Figure 5).

Le taux maximal de réduction est révélé chez la souche *Lactobacillus negelii* S6 avec un FICI de 0,56. Ainsi la CMI de l'értapénème chez *K. pneumoniae KPC-3* a été réduite de 128 mg/l à 32 mg/l ce qui correspond à un facteur de réduction de 8 fois. Cependant un effet synergique faible est observé avec la souche *K. pneumoniae NDM-1*.

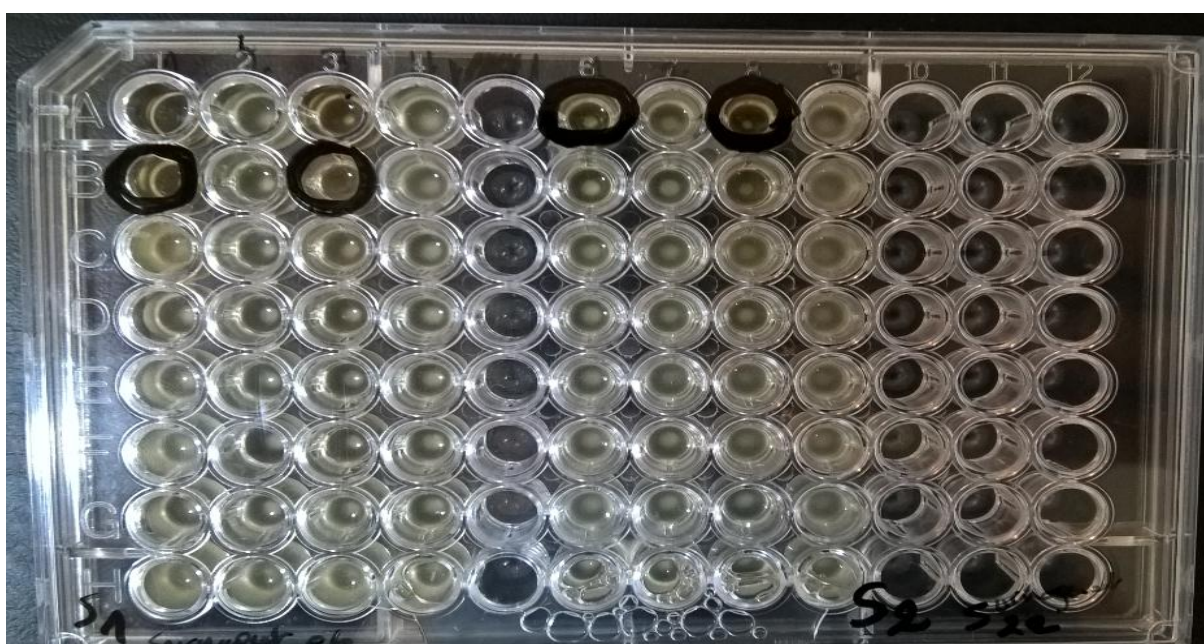


Figure 5 : Test de synergie de l'értapénème et du surnageant de *Lactobacillus Negelii* chez les souches *K. pneumoniae KPC-3* et *K. pneumoniae NDM-1*.

Discussions et Conclusion

Les antibiotiques ont pendant longtemps été utilisés pour améliorer les performances en élevage et en médecine humaine. Cette utilisation a entraîné une augmentation des risques d'antibio-résistance et d'hypersensibilité chez l'homme. Parmi les alternatives aux antibiotiques, l'utilisation de bactéries probiotiques, notamment les lactobacilles, a été proposée et elle a prouvé son efficacité sur la santé animale (Wilson, Sigeo, *et al.*, 2005)

Dans le présent travail, 19 souches de lactobacilles ont été mise en évidence pour tester leur activité antibactérienne à l'égard de souches multi-résistantes. L'activité de ces dernières a été révélée par l'application de deux tests différents (test des spots et des puits). Les résultats obtenus ont révélé une importante activité à l'égard des souches cibles avec des zones d'inhibitions bien distinctes dont le diamètre varie entre 20 à 36 mm et cela en fonction de la souche étudiée.

Des résultats similaires ont été rapportés par Labioui *et al.*, (2005), que d'une part, l'activité antibactérienne diffère d'une souche de *Lactobacillus* à l'autre. L'absence d'activité antibactérienne ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires.

Les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche de *Lactobacillus* peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture. En outre, les résultats de ce travail montrent aussi que l'activité antibactérienne du surnageant des souches lactobacilles testées dépend de la méthode utilisée (Prescott, Sherwood *et al.*, 2010)

Selon plusieurs auteurs, cet effet antibactérien serait dû à l'effet combiné des substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques comme les acides organiques essentiellement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, ou encore des substances antibactériennes de nature protéique (bactériocines) (Antanasova *et al.*, 2003; Lozo *et al.*, 2007).

D'autres travaux ont rapporté que des bactéries lactiques produisent des substances antibactériennes de nature protéique, pleinement actives à pH acide. Par conséquent, le fait que l'activité antibactérienne, du surnageant doué d'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries multirésistantes renforce l'hypothèse qu'elles seraient probablement du à la production aussi de bactériocines. (Wong et Chen, 1988 ; Podolak *et al.*, 1996, Wilson *et al.*, 2005).

Discussions et Conclusion

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Labioui *et al.* (2005), qui ont trouvé une différence dans l'activité antimicrobienne vis-à-vis *E. coli* des souches appartenant aux différents genres (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*). Cette différence d'activité a été reliée au pouvoir de substance antibactérienne de chaque souche.

Les résultats de l'association de l'értapénème au surnagent, ont montré que cette association aboutie à une synergie entre les deux composés antibactériens chez les deux souches multi-résistantes testées. Cette synergie a permis de réduire la CMI de l'Ertapénème. La réduction est révélée chez les souches *K.pneumoniae* NDM-1, *K. pneumoniae* KPC-3 avec un facteur de réduction égal à 4 fois, chez *K. pneumoniae* KPC-3.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la souche S6 (*Lactobacillus Negelii*) pourrait être utilisée comme alternative aux antibiotiques.

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaires, ils doivent être complétés par une série d'autres tests à savoir:

- Confirmé, isoler les composants de surnagent de souches de *Lactobacillus*
- Elargir l'étude de l'activité sur d'autres bactéries à Gram négatif et positif.
- Des tests de synergie en utilisant la bactériocine pure pour confirmer les résultats obtenus.

Références bibliographiques

- Adil., Bbanday K., Ahmad Bhat G. et shanaz S. (2011).** Response of broiler chicken to dietary supplementation of organic acids. *J.cent.Europ. Ogr.* 12,498-508.
- Beaugerie L. et Petit J.C. (2004).** Antibiotic-associated diarrhea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*
- Brashear M., jaroni D., Trimble J. (2003).** Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli*.
- Barefoot et Klaenhammer .,T.,Sowers E. G.,Wells J.G.,Green K. D.,Griffin P. M., HoekstraR.M.,STrockbin N.A.(1983).** Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *National Center for Infectious Diseases.*, 192 : 1422-1429.
- Chen Y., Ludescher R. D. et Montville T. J. (1997).** Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(12): 4770-7.
- De Vuyst L. et Vandamme E. J. (1994).** A bacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: Bacteriocin of lactic acid bacteria. Ed. Blacki Academic & Profitionel, Londre.
- Dortu C. et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio-conservation des produits alimentaires.
- Djamel Drider. (2013).** Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential to Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells.
- FAO/WHO. (2002).** Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ World Health organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food . London, Ontario, Canada, 1-11.
- Fay K. (2005).** Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques: impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. *Antibiotiques* 7, 45-52.
- Ganzle G.M., Holtzel A., Walter J., Jung G. et Hammes P.W. (2000).** Characterization of Reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH 2584. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Guérin J.L. et Balloy D. (2012).** Maladies des volailles. Ed. III, PARIN (France).
- Hammes W.P. et Hertel C. (2009).** Genus I. *Lactobacillus*. Dans: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Références bibliographiques

- Kalavathy R., Abdullah N., Jalaludin S., Ho Y.W. (2013).** Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Brit. poul. Sci.* 44,139-144.
- Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.*
- Labioui H., Elmoudali L., El Yachioui M. et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactérienne. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005,144, 237-250
- Prescott L., Sherwood L. M, Woolverton C. 2010.** Microbiologie. De Boeck Edition. ISBN-978-2-8041-6012-8
- Matilla-Sandholm T., Mättö J. et Saarela M. (1999).** LAB with health claim interactions and interference with gastrointestinal flora.
- Naghmouchi k., John Baah., Didier Hober., Eric Jouy., Cédric Rubrecht., Famara Sani., et Guérin J.L. et Balloy D. (2012).** Maladies des volailles. Ed. III, PARIN (France).
- Nissen-Meyer J., Hauge H.H., Fimland G., Eijsink V.G.H. et Nes I.E. (1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria: their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action. *Recent Res. Devel. Microbiol.*
- Pascual.A., Gerard. P. (1999).** Mammals from the Age of Dinosaurs: Origins, Evolution, and Structure.
- Sergine Even, 2017.** Probiotique et mammites bovines : une piste à suivre.
- Schillinger U., Lucke F K. (1989).** antibacterial activity of *Lb. sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.
- Yan Kraaij C., De vos W.M., Siezen O.P. et Kuipers O.P. (1999).** Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications.
- Wilson, A.R., Sigeo, D. et Epton, H.A.S. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1516-1522.
- Woodford N. Et Livermore D.M. (2009).** Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J. infect.*, 59:S4-S16.
- Wong, H.-C., et Chen, Y.-L. (1988).** Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2179-2184.
- Zacconi. C, scolari. G. (1999).** Effect of administration of *Lactobacillus Salivarius* and lactic microflora in chick digestive tract.

Références bibliographiques

Zalan Z, Hudacek J., Stetina J., Chumchalova J. et Halasz A. (2010). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. Eur. Food Res. Technol.

Résumé

L'objectif de ce travail était d'étudier le pouvoir antagoniste de 19 souches de *Lactobacillus*, vis-à-vis des souches multi-résistantes. Pour cela et dans un premier temps, le test des spots et le test des puits sont mis en œuvre. Ces tests ont permis de révéler l'activité inhibitrice des souches lactiques testées à l'égard des souches cibles par leur pouvoir de produire des substances antimicrobiennes. Dans un deuxième temps, un test de synergie est réalisé entre l'értapénème et le surnageant de culture. Les résultats ont montré la présence d'une synergie entre l'értapénème et les substances antibactériennes contenues dans le surnageant de culture.

Mots clés : Bactéries multi-résistantes, antagonisme, synergie, bactéries *Lactobacillus*, substances antimicrobiennes.

Abstract

The objective of this work was the study of the antagonistic effect of 19 lactic bacteria, towards multi-resistant strains. Firstly, the spot test and the well test were used. These tests revealed the inhibitory activity of the lactic strains tested used to test antimicrobial. In a second step, a synergy test was carried out between the értapénème and the *Lactobacillus* supernatant. The results showed the presence of a synergy between értapénème and the antibacterial substances contained in the lactobacillus supernatant.

Key words: Multi-resistant bacteria, antagonism, synergy, *Lactobacillus* bacteria, antimicrobial substances.